Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Freiburg i. Br.
Direktor: Prof. Dr. Bohnenkamp

Photometrische Auswertung der Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren und ihre Anwendung zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren im Stuhl

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Willy Rudolf Erdlenbruch
aus Wuppertal-Elberfeld

1936

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Freiburg i. Br.

Dekan: Prof. Dr. Wegner.
Referent: Doz. Dr. Jenke.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

In der letzten Zeit wurden Untersuchungen über den Gallensäurengehalt in Körperflüssigkeiten veröffentlicht, bei denen die Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren verwandt wurde. Derartige Untersuchungen wurden von Raue(1), Minnibeck(2) und Giordano-Levy(3) über den Gallensäurengehalt des Stuhles angestellt. Giordano bediente sich dieser Reaktion vor allem noch zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren im Blut.

Da die Fluoreszenzreaktion keine spezifische Reaktion der Gallensäuren ist, sondern gerade auch von solchen Stoffen gegeben wird, die natürlicherweise stets zusammen mit den Gallensäuren vorkommen, wie Cholesterin und seine Ester, Ölsäure, Lezithin und andere, so ist eine Voraussetzung bei der Anwendung der Fluoreszenzreaktion zur quantitativen Bestimmung der Gallensäuren in Körperflüssigkeiten, daß die Reaktion nur in Extrakten angestellt wird, die von allen störenden Beimengungen gereinigt sind. Außerdem war noch zu untersuchen, ob unter Verwendung exakter optischer Methoden die Fluoreszenzreaktion eine quantitative Auswertung gestattet. Von den angeführten Untersuchern, die bisher die Fluoreszenzreaktion zur quantitativen Bestimmung gebrauchten, ist keine der beiden erwähnten Voraussetzungen erfüllt worden. Von allen wurde die quantitative Auswertung der Fluoreszenzreaktion in der Weise vorgenommen, daß die zu untersuchende fluoreszierende Lösung fortlaufend so lange verdünnt wurde, bis bei bloßer visueller Betrachtung die Fluoreszenz gerade verschwand. Die genannten Autoren geben folgende Vorschrift:

„Man nimmt den die Gallensäuren enthaltenden, bei der Aufarbeitung gewonnenen Rückstand in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure auf und läßt 24 Stunden stehen, da sich dann die Fluoreszenz voll entwickelt hat. Dann bestimmt man durch fortschreitende Verdünnung die Grenze der noch eben sichtbaren Fluoreszenz. Eine Standardlösung, die man sich bei jeder Untersuchung herstellt und welche 0,01 g Cholsäure in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure enthält, wird gleichfalls fortschreitend verdünnt. Durch Vergleich beider Untersuchungsreihen bestimmt man den Gallensäurengehalt des Ausgangsmaterials."

Diese Methode ist umständlich und ihre Ergebnisse sind starken Schwankungen unterworfen, da die Ablesung bei Tageslicht vorgenommen wird und es von subjektiven Schätzungsfehlern abhängt, ob eine eben noch sichtbare Fluoreszenz erkannt wird oder nicht.

Wir haben deshalb versucht, die Fluoreszenz mit Hilfe des Stufenphotometers von Pulfrich zu messen.

Fluoreszenzmessung mit Hilfe des Pulfrich-Photometers.

Um die Methode der Fluoreszenzmessung der Gallensäuren besser verstehen zu können, soll eine kurze allgemeine Beschreibung vorausgehen. (Eine genaue Gebrauchsanweisung des Photometers findet sich zum Beispiel bei Heilmeyer(4).

Zu Fluoreszenzmessungen an Flüssigkeiten sind erforderlich:

1. Eine Quecksilberdampf-Quarzlampe mit Filter, die zur Erzeugung des fluoreszenzerregenden ultravioletten und blauen Lichtes dient. Das Filter ist so angebracht, daß das vom Brenner ausgehende fluoreszenzerregende Licht annähernd horizontal austreten kann. Je nach der Art des angewandten Filters kann man das sichtbare erregende Licht ganz oder teilweise zurückhalten, so daß unter Umständen nur noch das ultraviolette Licht wirksam ist. (Filterwahl siehe später!)
2. Ein Pulfrich-Photometer mit zwei Cuvettenhaltern und einigen Glas- oder Quarzcuvetten.

Vor die Photometeröffnungen werden die Cuvettenhalter eingesetzt, welche an ihrer vorderen, der Lampe zugekehrten Kante die mit der zu untersuchenden Lösung angefüllten Glas- oder Quarzcuvetten enthalten. Beim Einblick in das Okular sieht der Beobachter die Gesichtsfelder durch das von der Flüssigkeit kommende Fluoreszenzlicht beleuchtet. Am Photometer sind zwei Meßtrommeln angebracht; diese betätigen eine Blende, welche durch Drehen der Trommel geöffnet (Einstellung auf 100) oder geschlossen werden kann (Einstellung auf 0).

Die richtige Einstellung des Photometers zur Quarzlampe ist dann erreicht, wenn beide Hälften des Gesichtsfeldes, gleiche Einstellung der Meßtrommeln vorausgesetzt, gleich hell erscheinen. Diese Einstellung kann durch Verschieben der Quarzlampe erreicht werden. In der Literatur wird auch Verwendung von Grauscheiben empfohlen (siehe Heilmeyer S. 43). Fehler durch Unterschiede in der Beleuchtung lassen sich ausschalten, wenn man jede Messung nach Vertauschen der auf beiden Seiten befindlichen Cuvetten wiederholt und den Mittelwert aus den links und rechts erhaltenen Ablesungen nimmt.

Meßvorgang.

Der Meßvorgang spielt sich in folgender Weise ab:

Zunächst werden die mit der fluoreszierenden Flüssigkeit angefüllten Cuvetten in der schon beschriebenen Weise eingesetzt. Im allgemeinen werden für die Untersuchungs- und Vergleichsflüssigkeit Cuvetten gleicher Schichtdicke benutzt (über die Wahl der Schichtdicke bei der Messung der Gallensäuren siehe später!).

Dann wird durch Drehen an der Filterscheibe hinter dem Okular ein geeignetes Filter vorgeschaltet. Die Messung kann gegen eine Standardlösung oder gegen ein Fluoreszenzglas (zum Beispiel Uranglas) vorgenommen werden.

Die photometrische Einstellung geschieht folgendermaßen: Die eine Meßtrommel (auf Seiten der zu untersuchenden Lösung) wird auf 100 gestellt; die andere Meßtrommel (auf Seiten der Standardlösung) wird solange gedreht, bis gleiche Helligkeit erreicht ist. Auf diese Weise gibt die Ablesung direkt die Fluoreszenzintensität der untersuchten Lösung in Prozenten der Standardlösung an, wenn die Fluoreszenzhelligkeit der Standardlösung gleich 100 % gesetzt wird. Ist die zu untersuchende Lösung heller als die Standardlösung, so wird die feststehende Trommel nicht auf 100, sondern auf eine passende kleinere Zahl, zum Beispiel 50, 25 usw. eingestellt; der an der Vergleichstrommel eingestellte Wert wird entsprechend multipliziert, in unserem Beispiel mit 2, 4 usw. Es sei noch bemerkt, daß es für die Meßgenauigkeit wichtig ist, Ablesungen über 80 und unter 2 zu vermeiden. Für genauere Untersuchungen wird man die Ablesungen mehrmals (etwa 5mal) wiederholen, dann die Cuvetten vertauschen und nochmals eine Reihe von Ablesungen vornehmen. Als Resultat nimmt man dann das arithmetische Mittel der rechts und links erhaltenen Ablesungen.

Bei der Fluoreszenzmessung der Gallensäuren mußten noch einige Voruntersuchungen gemacht werden. Diese erstreckten sich auf:

1. die Wahl der Schichtdicke und Konzentration der Lösung,
2. auf die Wahl des anzuwendenden Filters,
3. auf die Herstellung einer Eichkurve.

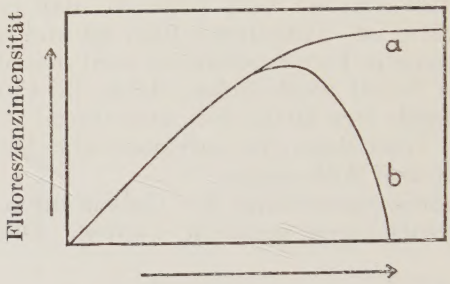
1. Die Wahl der Konzentration und Schichtdicke der Lösung.

Es ist einleuchtend, daß die Wahl der Konzentration und Schichtdicke einer Lösung bei der Fluoreszenzmessung nicht gleichgültig ist, da die Absorptionsverhältnisse der Lösung von großer Bedeutung sind. Wir betrachten zunächst die Absorption des erregenden Lichtes bei verschiedener Konzentration, aber gleichbleibender Schichtdicke. Bei sehr geringen Konzentrationen ist sie so klein, daß alle Teile der Flüssigkeitsschicht praktisch mit der gleichen Intensität bestrahlt werden und daher auch gleichstark fluoreszieren. In diesem einfachsten Falle wird die Fluoreszenzintensität der Konzentration proportional sein. Bei einer Verdoppelung der Konzentration wird auch eine Verdoppelung der Fluoreszenzintensität gefunden. Bei stärker zunehmender Konzentration nimmt die Absorption jedoch in dem Maße zu, daß schließlich eine merkliche Schwächung des fluoreszenzerregenden Lichtes in Richtung der Beleuchtung auftritt. Die der

Lichtquelle abgewandten Teile der Lösung werden nur noch in geringerem Maße bestrahlt und fluoreszieren deshalb auch nicht so stark wie die der Lichtquelle zugewandten Teile. Bei einer Steigerung der Konzentration über eine gewisse Grenze hinaus steigt also die Fluoreszenz nicht mehr proportional, sondern in geringerem Maße an und erreicht schließlich einen Grenzwert, die sogenannte „optische Sättigung der Lösung". In diesem Falle werden die der Lichtquelle abgewandten Teile des Flüssigkeitstroges praktisch überhaupt nicht mehr von dem erregenden Lichte getroffen und tragen daher auch nicht mehr zur Fluoreszenz bei.

Die Abhängigkeit von der Konzentration ergibt sich aus der Kurve *a* (Abb. I). Dabei ist vorausgesetzt, daß nur das fluoreszenzerregende Licht absorbiert wird.

Abbildung I.



Die Fluoreszenzhelligkeit in Abhängigkeit von der Konzentration (Schichtdicke)

Kurve a: unter der Annahme, daß das Fluoreszenzlicht in der Lösung nicht absorbiert wird.

Kurve b: unter der Annahme, daß Absorption innerhalb der Lösung eintritt.

Wir müssen jetzt noch den Einfluß betrachten, den die Absorption des Fluoreszenzlichtes selbst innerhalb der zu messenden Lösung ausübt (Kurve *b*, Abb. I). Bei kleinen Konzentrationen ist dieser Einfluß wieder verschwindend, so daß mit einer für praktische Zwecke ausreichenden Genauigkeit ein linearer Anstieg der Fluoreszenzkonzentrationskurve gewährleistet ist. Mit steigender Konzentration muß die zur Messung gelangende Fluoreszenzintensität infolge der Eigenabsorption innerhalb der Lösung in zunehmendem Maße zurückbleiben hinter dem Wert, der sich aus der Kurve *a* ergeben würde. Das gilt um so mehr, als die leuchtende Schicht der Flüssigkeit bei steigender Konzentration immer schmäler wird, wie schon oben ausgeführt, so daß das Fluoreszenzlicht immer größere Strecken durchlaufen muß, bis es zur Mes-

sung gelangt. Diese Absorptionseinflüsse kommen weniger zur Auswirkung, wenn wir kleinere Schichtdicken wählen. Je dicker die Schichtdicke, um so stärker wirkt sich die Absorption bei der Messung aus. Man wird bestrebt sein, möglichst kleine Schichtdicken und Konzentrationen zu nehmen; doch ist eine Grenze dadurch gegeben, daß die Meßgenauigkeit bei stark abnehmender Helligkeit sinkt. Als weitere Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzhelligkeit mit steigender Konzentration ist die sogenannte Auslöschung zu nennen. Darunter versteht man die Verminderung der Fluoreszenzhelligkeit durch die mit steigender Konzentration sich häufenden Zusammenstöße der gelösten Moleküle. Ich möchte aber an dieser Stelle ausdrücklich betonen, daß sich die Einflüsse der Absorption und Auslöschung durch die Wahl der geeigneten Konzentration und Schichtdicke so stark vermindern lassen, daß sie praktisch kaum ins Gewicht fallen. Ferner sei bemerkt, daß die Durchführbarkeit fluorimetrischer Konzentrationsmessungen grundsätzlich nicht an die Proportionalität mit der Konzentration gebunden ist, da stets die Möglichkeit besteht, die Abhängigkeit von der Konzentration und Schichtdicke auf empirischem Wege zu bestimmen und in Form einer Eichkurve aufzuzeichnen, aus der zu jeder Ablesung am Photometer direkt die Konzentration der untersuchten Lösung entnommen werden kann (Eichkurve der Cholsäure siehe später!).

2. Die Wahl des Filters.

Bei der Beschreibung der Methode der Fluoreszenzmessung wurde schon darauf hingewiesen, daß zwischen der Quecksilberlampe und dem Flüssigkeitstrog ein Filter eingeschaltet ist. Bei der Verwendung eines Ultraviolettfilters (UG_2, Schott) werden die sichtbaren erregenden Strahlen praktisch ganz zurückgehalten, bis auf etwas Rot, das durch eine Kupfersalzlösung absorbiert wird. In diesem Falle ist die Einschaltung eines Filters am Okular weniger wichtig. Ein Kupferoxyd-Ammoniak-Filter (Filterbezeichnung nach Firma Zeiß), das wir verwandt haben, läßt dagegen noch violette und blaue Strahlen durch. Das kann unter Umständen sehr erwünscht sein, wenn man große Fluoreszenzhelligkeit erzielen will. Bei unseren Fluoreszenzmessungen an Stuhlextrakten war die Vorschaltung eines zweiten Filters, abgesehen von der Zurückhaltung der violetten und blauen erregenden Strahlen, noch aus folgenden Gründen notwendig:

Wenn die beiden Lösungen, deren Fluoreszenz verglichen wird (zum Beispiel Stuhlextrakt und Standardlösung), in ihrer chemischen Zusammensetzung nicht vollständig übereinstimmen, kann die Fluoreszenzemission selbst verschieden sein oder durch Einflüsse der Absorption verschiedenartig verändert werden. In diesen Fällen ist es notwendig, aus dem Gesamtbereich der Fluoreszenz einzelne Bereiche auszuwählen, um die notwendige Farb-

gleichheit der beiden Hälften des Photometergesichtsfeldes herzustellen.

Wir haben bei unseren Messungen folgende Filter verwandt:

1. **das Filter L_I**, dessen Durchlässigkeit bei 5800 Å beginnt und von etwa 6100 Ångström (Å) auf nahezu 90 % steigt.
2. **das Filter K_v**, dessen Maximum der Durchlässigkeit bei 5040 Å liegt. Nach langen Wellen zu schneidet das Filter bei etwa 5500 Å ab (längere Wellen läßt es also nicht durch). Anfänglich wurden noch zwei K-Filter versucht, deren Hauptdurchlässigkeitsgebiet sich zwischen L_I und K_v einschiebt, und **das Filter S_{53}**.

Da wir es bei den Stuhlbearbeitungen mit gefärbten Lösungen zu tun haben, die eine relativ starke Absorption zeigen, sind die Messungen mit dem Filter L_I als günstiger anzusehen, da die Absorption im Rot geringer ist als im Grün. Es sei bei dieser Gelegenheit darauf hingewiesen, daß an sich die Messung mit dem Filter L_I außerhalb des Hauptbereiches der Fluoreszenz liegt, denn die Fluoreszenz erscheint dem Auge grün.

Bei einer Meßreihe am Spektro-Photometer ergab sich, daß die Absorption einer 25 mg%igen Cholsäurelösung bei 6570 Å nur sehr gering ist: etwa $^1/_{18}$—$^1/_{20}$, bei 6000 Å etwa $^1/_8$ des Wertes, der für 5100 Å gefunden wurde. Für eine Stuhlbearbeitung ergaben sich entsprechend die Werte $^1/_4$ bei 6570 Å und $^4/_{10}$ bei 6000 Å, wieder im Vergleich zur Absorption bei 5100 Å.

Beim Vergleich der beiden Filter ist noch zu beachten, daß aus meßtechnischen Gründen verschiedenes erregendes Licht verwandt wurde, und zwar zur Erzielung größerer Helligkeit mit L_I nur die Kupferoxyd-Ammoniak-Lösung. Es sind dann hauptsächlich die Quecksilberlinien bei 3650 Å, 4050 Å und 4350 Å erregend wirksam. Um sichtbares erregendes Licht auszuschalten, muß bei Verwendung von K_v noch ein Ultraviolettglas (UG_2-Glas von Schott) dazugeschaltet werden, so daß jetzt die Liniengruppe bei 3650 Å die hauptsächlich für die Erregung wirksame ist. Dieser Unterschied in der Wellenlänge des erregenden Lichtes wirkt auch in der Richtung, daß die Eichkurve mit K_v früher von der Geradlinigkeit abweicht als mit L_I, denn in allen von uns aufgenommenen Absorptionskurven ist die Absorption bei 3650 Å größer als bei 4350 Å (siehe Eichkurve!).

Die Einflüsse von Schichtdicke, Konzentration und Filter auf die Fluoreszenzhelligkeit gehen aus Tabelle I hervor. Diese gibt ein Meßbeispiel für eine 100 mg %ige Cholsäurelösung im Vergleich zu einer 1 mg %igen Cholsäurelösung. Beide Lösungen wurden bei verschiedener Schichtdicke mit den Filtern L_I und S_{53} verglichen. In der Tabelle sind die Werte für 10 mm Schichtdicke und 100 mg%ige Cholsäure = 100 gesetzt. (Siehe Tabelle I.)

Aus dieser Tabelle ersieht man, daß die Fluoreszenzhelligkeit der konzentrierten Lösung bei Verwendung von dünneren Schicht-

Tabelle I.

Filter	Schichtdicke			
	10 mm	5 mm	1 mm	
L_I	100	120	80	(100 mg% Cholsäure)
	22	10	2	(1 mg% Cholsäure)
S_{53}	100	420	750	(100 mg% Cholsäure)
	250	140	25	(1 mg% Cholsäure)

dicken ansteigt, während das bei Verwendung der geringeren Konzentration nicht zutrifft. Dieser Fluoreszenzanstieg ist bei Verwendung von S_{53} viel größer als bei L_I. Diese Tatsache spricht für eine bessere Brauchbarkeit des Filters L_I für unsere Zwecke.

3. Herstellung der Cholsäure-Eichkurve.

Auf Seite 7 wurde schon darauf hingewiesen, daß die fluorimetrische Konzentrationsmessung grundsätzlich nicht an die Proportionalität von Konzentration und Schichtdicke gebunden ist; es besteht nämlich die Möglichkeit, die Abhängigkeit von diesen beiden Faktoren empirisch zu ermitteln und in Form einer Kurve festzulegen, aus der man ohne weiteres die Konzentration der untersuchten Lösung ermitteln kann, wenn man den an der Meßtrommel des Photometers abgelesenen Wert kennt. Bei der Herstellung der Cholsäure-Eichkurve ging ich in folgender Weise vor:

10 mg Cholsäure wurden in 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure aufgelöst und in einem mit Glasstöpsel versehenen Reagensglas 24 Stunden stehen gelassen. Von dieser 100 mg%igen Cholsäurelösung wird eine Verdünnungsreihe (eine 50-, 25-, 20- usw. bis 1 mg%ige Cholsäurelösung) in der Weise hergestellt, daß entsprechende Mengen abgemessen und mit konzentrierter Schwefelsäure auf 10 ccm aufgefüllt werden. Diese Lösungen wurden mit einer 3 mg%igen Cholsäurelösung verglichen, welche sich als Standardlösung sehr gut brauchbar erwies, da ihre Fluoreszenzhelligkeit ausreichend und ihre Absorption gering ist. Als Schichtdicke diente ein 1 mm-Trog, dessen Verwendung, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, als zweckmäßig erschien. Dann wurden die Fluoreszenzhelligkeiten auf der Ordinate, die verschiedenen Cholsäurekonzentrationen auf der Abscisse eingetragen; durch Verbindung der entsprechenden Punkte ergab sich die Eichkurve (Abb. II).

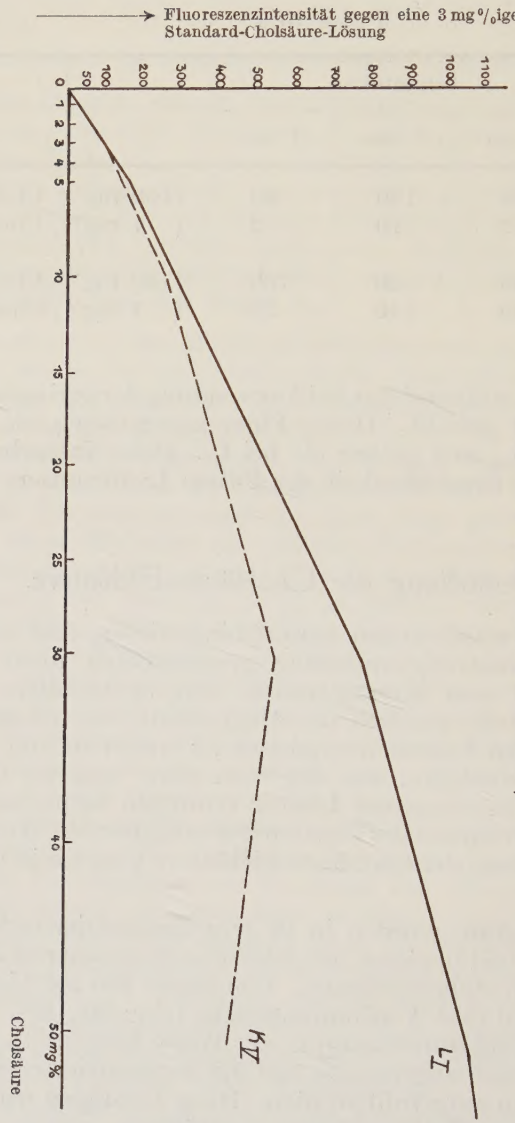


Abbildung II.

Cholsäureeichkurve.

(Schichtdicke 1 mm; Filter L_1 und K_1)

Die untere Grenze der Cholsäurekonzentration, die mit unserem Meßverfahren noch bestimmbar ist, hängt weitgehend von den Meßbedingungen ab (Stärke des erregenden Leichtes, Adaption des Auges usw.).

Zur Veranschaulichung sei gesagt, daß wir noch Messungen an 0,1 mg%igen Cholsäurelösungen durchgeführt haben. Da die Meßcuvette von 1 mm Schichtdicke 0,35 ccm Flüssigkeit faßt, also bei einer 0,1 mg%igen Lösung nur 0,35 γ = 0,00000035 g

Cholsäure enthält, so läßt sich mit dieser Methode noch 0,35 γ Cholsäure optisch nachweisen.

Da man den Rückstand z. B. einer Stuhlbearbeitung nicht gut in 0,35 ccm auflösen kann, wird man zum Nachweis geringer Cholsäuremengen den Rückstand z. B. in 1 ccm konzentrierter H_2SO_4 auflösen. Es wäre dann unter unseren Meßbedingungen die zum sicheren Nachweis erforderliche Cholsäuremenge $1\,\gamma = 0{,}000001$ g; doch bestehen, wenn die Entfernung von Begleitstoffen in genügendem Maße gelungen ist, keine Bedenken gegen die Verwendung von größeren Schichtdicken; die Nachweisgrenze läßt sich auf diese Weise wieder auf den oben angegebenen Wert von $0{,}35\,\gamma = 0{,}00000035$ g herabdrücken.

Meßvorgang der Gallensäuren-Fluoreszenz mit Hilfe des Photometers.

Die gallensauren Salze lösen sich, mit konzentrierter Schwefelsäure zusammengebracht, zu einer rotgelben, stark in grün fluoreszierenden Flüssigkeit. Diese Fluoreszenz wurde zu einer Methode der quantitativen Schätzung der Gallensäuren ausgearbeitet (Raue, Minnibeck), die manche Nachteile hat, auf die schon hingewiesen wurde. Deshalb habe ich versucht, eine neue Methode der Fluoreszenzmessung der Gallensäuren auszuarbeiten, die bei Beherrschung der Technik von jedem schnell ausgeführt werden kann und zu einem exakten Ergebnis führt. (Ungünstiger liegen die Verhältnisse in Bezug auf die chemische Isolierung der Gallensäuren; darauf soll später noch genauer eingegangen werden.)

Nachdem in den Voruntersuchungen die Abhängigkeit der Gallensäuren-Fluoreszenz von der Konzentration und Schichtdicke, weiterhin die Wahl des passenden Filters und Fluoreszenz-Standards und die Eichkurve ermittelt worden waren, bereitete die quantitative Bestimmung der Gallensäuren-Fluoreszenz mit Hilfe der neuen Meßmethode keine Schwierigkeiten mehr.

Der Meßvorgang spielt sich in folgender Weise ab:

Der die Gallensäuren enthaltende Rückstand, zum Beispiel einer Stuhlbearbeitung, wird in der üblichen Weise mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Gleichzeitig wird eine 100 mg%ige Cholsäurelösung in der Weise hergestellt, daß 10 mg Cholsäure in 10 ccm konz. Schwefelsäure aufgelöst werden. Nach 24 Stunden macht man sich eine 3 mg%ige Standardlösung, indem man 0,3 ccm der 100 mg%igen Lösung abpipettiert und mit konz. Schwefelsäure auf 10 ccm auffüllt. Von dem zu untersuchenden Stuhlextrakt wird je nach der

schon mit bloßem Auge abschätzbaren Fluoreszenzintensität eine 5-, 10- oder 20%ige Verdünnung hergestellt, indem man 0,5, 1 oder 2 ccm des Stuhlextraktes abpipettiert und mit konz. Schwefelsäure auf 10 ccm auffüllt. Hierauf werden die Stuhlextraktverdünnung und die 3 mg%ige Standardlösung in Cuvetten von 1 mm Schichtdicke eingefüllt und zum Vergleich vor die Photometeröffnung gebracht. Man stellt die Meßtrommel der zu untersuchenden Lösung auf 100 oder eine passende kleinere Zahl und dreht mit der andern Trommel solange, bis gleiche Helligkeit im Photometergesichtsfeld erreicht ist. Zur Kontrolle werden 3—5 Ablesungen gemacht, dann die Cuvetten vertauscht und erneut abgelesen. Aus den rechts und links erhaltenen Ablesungen wird dann der Mittelwert bestimmt.

Um die Genauigkeit unserer Untersuchungen zu kontrollieren, wurden verschiedene Verdünnungen des (gleich 100 % gesetzten) Stuhlextraktes mit der Standardlösung verglichen. Dabei ergab sich eine gute Übereinstimmung der Werte.

In Tabelle II sind zwei Meßbeispiele angeführt:

1. eine 10%ige, 2. eine 20%ige Stuhlextraktverdünnung, bei welchen eine 3 mg%ige Cholsäure-Standardlösung als Vergleichslösung genommen wurde.

Tabelle II.

(Schichtdicke 1 mm, Filter L_I, Standardlösung = 3 mg%ige Cholsäurelösung)

1. 10%ige Stuhlextraktverdünnung:
(zugehörige Meßtrommel auf 50 eingestellt)

Filter	Abgelesene Werte		Mittelwert
	1. Ablesung	2. Ablesung (Nach Vertauschen der Cuvetten)	
L_I	40 39,5 37 37,5 40	45 44 43 42	41,3

Da die Einstellung der Meßtrommel nicht auf 100, sondern auf 50 erfolgte, muß der abgelesene Wert mit 2 multipliziert werden; diesen Wert dividiert man durch 100, denn die Ablesung gibt die Fluoreszenzintensität der untersuchten Lösung in Prozenten der Standardlösung an. Die Fluoreszenz des unverdünnten (= 100%igen) Stuhlextraktes ergibt sich durch Multiplikation

mit 3 (entsprechend der 3 mg%igen Vergleichslösung) mal Verdünnungsfaktor, in unserem Beispiel:

$$\frac{2}{100} \cdot 41{,}3 \cdot 3 \cdot 10 = 24{,}7$$

Der unverdünnte Stuhlextrakt fluoresziert so stark wie eine 24,7 mg%ige Cholsäurelösung; die in 10 ccm aufgelöste Cholsäuremenge beträgt demnach 2,47 mg.

2. 20%ige Stuhlextraktverdünnung:
(zugehörige Meßtrommel auf 25 eingestellt)

Filter	Abgelesene Werte		Mittelwert
	1. Ablesung	2. Ablesung (Nach Vertauschen der Cuvetten)	
L_I	40	33	38,7
	41	34	
	42	35	
	45	35,5	
	45	34	
	45	35	

Berechnung: Da die Meßtrommel auf Seiten der zu untersuchenden Lösung auf 25 eingestellt worden war, erfolgt die Berechnung der Fluoreszenz der unverdünnten (100%igen) Stuhlextraktverdünnung:

$$\frac{4}{100} \cdot 38{,}7 \cdot 3 \cdot 5 = 23{,}2 \text{ mg\%}$$

Für den unverdünnten (= 100%igen) Stuhlextrakt ergibt sich bei der Auswertung

der 10%igen Verdünnung: Fluoreszenz = 24,7 mg%ige Chols.
der 20%igen Verdünnung: Fluoreszenz = 23,2 mg%ige Chols.

Da wir den Rückstand in 10 ccm konz. Schwefelsäure aufgelöst haben, enthält der Stuhlextrakt nach der

1. Berechnung: 2,47 mg Cholsäure,
2. Berechnung: 2,32 mg Cholsäure.

Beide Verdünnungen führen demnach zu einem gut übereinstimmenden Wert (Differenz 6%).

Dieselbe gute Übereinstimmung wurde bei vielen anderen Stuhlextraktfluoreszenzmessungen erreicht. Hier sei nur ein weiteres Beispiel herausgegriffen:

Tabelle III zeigt ein Meßbeispiel einer 5%igen und 10%igen Stuhlextraktverdünnung im Vergleich zur 3 mg%igen Cholsäure-Standardlösung.

Tabelle III

(Schichtdicke 1 mm, Filter L_I, Standardlösung = 3 mg%ige Cholsäurelösung)

1. 5%ige Stuhlextraktverdünnung:
(zugehörige Meßtrommel auf 100 eingestellt)

Filter	Abgelesene Werte		Mittelwert
	1. Ablesung	2. Ablesung (Nach Vertauschen der Cuvetten)	
L_I	28	38	33,7
	31	37	
	28,5	39	
	29	39	
	30,5	37	

Berechnung: $\frac{33,7}{100} \cdot 3 \cdot 20 = 20,8$ mg%ige Cholsäure.

In 10 ccm sind demnach 2,08 mg Cholsäure gelöst.

2. 10%ige Stuhlextraktverdünnung:
(zugehörige Meßtrommel auf 50 eingestellt)

Filter	Abgelesene Werte		Mittelwert
	1. Ablesung	2. Ablesung (Nach Vertauschen der Cuvetten)	
L_I	27	36	32,2
	28	37	
	29	35,5	
	27	36	
	29	37,5	

Berechnung: $\frac{32,2}{100} \cdot 2 \cdot 3 \cdot 10 = 19,32$ mg%ige Cholsäure.

In 10 ccm sind demnach 1,93 mg Cholsäure gelöst.

Der unverdünnte Stuhlextrakt enthält nach der

1. Berechnung: 2,0 mg Cholsäure,
2. Berechnung: 1,93 mg Cholsäure.

Auch hier wieder eine gute Übereinstimmung der Werte (Differenz 3,5%).

Das Absorptionsspektrum der Cholsäure in konz. Schwefelsäure.

Von einer Reihe meiner Präparate wurden von Herrn Dr. Bandow Absorptionsspektren aufgenommen. Auf die Versuchstechnik soll hier im einzelnen nicht eingegangen werden; es wurde mit dem spektrographischen Verfahren unter Anwendung eines rotierenden Sektors gearbeitet.

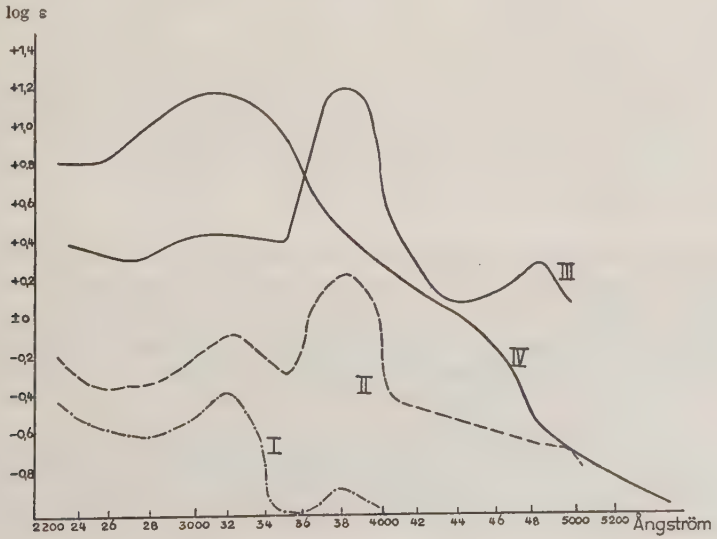
Die wiedergegebenen Kurven stellen den Log. des Absorptionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar. Der Absorptionskoeffizient ε wurde nach der Gleichung $J = J_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot d}$ berechnet.

Abbildung III zeigt die Absorptionskurve für Cholsäure in konz. Schwefelsäure in verschiedenen Konzentrationen. Die Absorptionsspektren wurden 24 Stunden nach dem Ansetzen der Fluoreszenzreaktion aufgenommen. Die in der Literatur erwähnte Bande in gelb (Giordano) tritt hier nicht hervor, da sie viel schwächer ist als die weiter kurzwellig gelegene Absorption; sie ist daher zum Nachweis weniger empfindlich. Bei mittleren Konzentrationen liegt die Hauptbande der Absorption bei 3850 Å;

Abbildung III.

Absorptionskurven.

I. 0,3 mg% Cholsäurelösung (in konz. H_2SO_4)
II. 3 mg%ige „ („ „ „) } 24 Stunden alt
III. 30 mg%ige „ („ „ „) }
IV. 10 mg Ölsäure in 10 ccm konz. H_2SO_4



ferner tritt noch eine viel schwächere Selektivität im Blau-grün und eine weitere Bande bei 3100 Å hervor. Das gegenseitige Verhältnis der Absorptionsbanden hängt, wie die Abbildung zeigt, von der Konzentration ab und wurde bei verschiedenen Wiederholungsaufnahmen der 3 mg%igen Cholsäure etwas schwankend gefunden. Es sei aber ausdrücklich betont, daß in der 3 mg%igen Cholsäurelösung, wie wir sie für unsere Fluoreszenzmessungen als geeignet gefunden haben, stets die Bande bei 3850 Å die stärkste und am deutlichsten selektiv hervortretende ist.

Über die Absorption einiger anderer Stoffe in konz. Schwefelsäure nach 24stündigem Stehen sei kurz folgendes gesagt:

1. Cholesterin: Starke Absorption bei 3000 Å.
   Schwache selektive Bande bei 4250 Å.

2. Natrium taurocholat: Absorptionsbanden bei 3050 Å
   „ „ 3800 Å
   „ „ 4900 Å.

3. Natrium-dehydrocholat: Mehrere mäßig selektive Banden zwischen 5000 und 3000 Å, ohne daß eine derselben besonders hervortreten würde.

4. Ölsäure (siehe unter Absorptionskurven Nr. IV Abb. III). 100 mg%ige Lösung: starke Absorption bei etwa 3100 Å.

An dieser Stelle sei noch einiges über die Stärke der Ölsäure-Fluoreszenz gesagt, auf die ich bei den Stuhlaufarbeitungen noch zurückkommen werde.

Wir haben eine 24 Stunden alte 100 mg%ige Ölsäurelösung in konz. Schwefelsäure mit einer gleichalten 3 mg%igen Cholsäure-Standardlösung verglichen (Schichtdicke 1 mm, Filter L_I und K_v). Nach unserer Fluoreszenzmessung ergab sich für die Fliter L_I und K_v eine Fluoreszenzhelligkeit wie die einer 1,2 bzw. 1,25 mg%igen Cholsäurelösung.

Wenn wir mit der Liniengruppe 3650 Å (mit dem UG-Filter) erregen, entspricht die Absorption der 100 mg%igen Ölsäurelösung ungefähr der 30 mg%igen Cholsäurebearbeitung; da die Fluoreszenz aber nur einer 1,2 mg%igen Cholsäure entspricht, ergibt sich, daß die Ölsäure in konz. Schwefelsäure ein viel geringeres Fluoreszenzvermögen hat als die Cholsäure.

Auch bei Betrachtung der Quecksilberlinien bei 4050 und 4350 Å, die bei der Erregung mitbeteiligt sind, wenn wir das erregende Licht nur mit Kupferoxyd-Ammoniak filtern, kommen wir zu demselben Schluß.

In unseren weiteren Untersuchungen beabsichtigten wir nunmehr, quantitative Bestimmungen des Gallensäurengehaltes des Stuhles mit Hilfe der im vorstehenden beschriebenen Fluoreszenzmessung auszuführen.

Da, wie bereits erwähnt, die Fluoreszenzreaktion der Gallensäuren keine spezifische Reaktion der Gallensäuren ist, mußte bei der Aufarbeitung des Stuhles erreicht werden, daß

1. zur Anstellung der Reaktion ein von allen störenden Beimengungen gereinigter Extrakt zur Verwendung kam, und

2. im Modellversuch zugesetzte Gallensäurenmengen quantitativ wiedergefunden wurden.

Die Aufarbeitung des Stuhles nach der Vorschrift von Giordano und Minnibeck (2) ergab nach beiden Richtungen unbefriedigende Ergebnisse. Die von Giordano und Minnibeck empfohlene Methode ist folgende:

„1 g Fäzes werden mit 30 ccm 95%igem Alkohol unter Rückflußkühlung kochend extrahiert. Dann wird durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird eingedampft. Der trockene Rückstand wird zuerst zur Beseitigung des Cholesterins mit Äther behandelt und der Äther in einen Scheidetrichter gegossen. Jener Teil des eingedampften Filtrats, der sich nicht in Äther löst, wird in destilliertem Wasser aufgenommen und zu dem Ätherextrakt im Scheidetrichter hinzugefügt. Hierauf trennt man die wässerige Lösung von dem oben stehenden Äther. Die wässerige Lösung wird filtriert. Dann kommen zwei Messerspitzen Bleiazetat und einige Tropfen Ammoniak hinzu. Der die Gallensäuren enthaltende Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und mit 95%igem Alkohol unter Rückflußkühlung kochend extrahiert. Der gallensäurenhaltige Auszug wird mit einigen Tropfen 10%iger Natronlauge versetzt und zur Trockne eingedampft. Der Trockenrückstand wird in absoluten Alkohol aufgenommen, die Lösung in ein anderes Gefäß übertragen, filtriert und noch einmal eingedampft. Man nimmt nunmehr diesen, die Gallensäuren enthaltenden Rückstand in 10 ccm konz. Schwefelsäure auf und läßt 24 Stunden stehen."

Die quantitave Auswertung der Fluoreszenz haben wir nunmehr nach unserer oben beschriebenen Methode mit dem Pulfrichschen Photometer vorgenommen.

Die Ergebnisse waren unbefriedigend, da sich zeigte, daß ein Teil der Fluoreszenz auf andere Körper, insbesondere Ölsäure, zu beziehen war und andererseits zugesetzte Gallensäuren nur mit einem Verlust von 15—20 % wiedergefunden werden konnten. Von unseren vielen Stuhluntersuchungen, die nach der Minnibeckschen Methode aufgearbeitet wurden, seien nur folgende Beispiele angeführt:

Stuhl	1 g Stuhl ohne Zusatz	1 g Stuhl + 100 mg Ölsäure	1 g Stuhl + 10 mg Cholsäure
Gefundene Cholsäuremenge	2,3 mg	3,3 mg	9,85 mg
Berechnete Cholsäuremenge	—	2,3 mg	12,3 mg
Differenz	—	+ 40 %	— 20 %

Es ist ersichtlich, daß ein erheblicher Teil der zugesetzten Ölsäure an der Fluoreszenz mitbeteiligt ist. Nach unseren Untersuchungen fluoresziert eine 100 mg%ige Ölsäurelösung in konz. Schwefelsäure etwa so stark wie eine 1,2 mg%ige Cholsäurelösung, so daß in vorstehendem Versuch die Differenz auf etwa 80 % der zugesetzten Ölsäure zu beziehen ist. Dieses Ergebnis ist aus der angewandten Methode der Aufarbeitung des Stuhles zu erklären:

Bei der Minnibeck'schen Methode wird zwar die Ölsäure mit Bleiazetat ausgefällt; beim Kochen des Niederschlages mit Alkohol, wie es in der Vorschrift angegeben ist, geht jedoch ein erheblicher Teil der Ölsäure wieder in Lösung (siehe auch Beilstein: Handbuch der organischen Chemie! (5)). Es ist somit durch unsere angeführten Versuche als gesichert anzusehen, daß eine quantitative Entfernung der Ölsäure, wie sie Giordano und Minnibeck mit ihrer Bleifällung bezweckten, nicht erreicht wird. Tatsächlich bestimmen Giordano und Minnibeck bei ihren Fluoreszenzmessungen auch zum Teil Ölsäure.

Es war daher unser Bestreben, mit anderen Methoden die Ölsäure zu entfernen. Es gelang uns, die Ölsäure quantitativ auszuschalten, indem wir die Fettsäuren mit Bariumchlorid bei ammoniakalischer Reaktion ausfällten. Die Gallensäuren bleiben dabei in Lösung.

Nach vielen Versuchen, die aus räumlichen Gründen hier nicht wiedergegeben werden können, gestaltete sich unser Verfahren schließlich folgendermaßen:

Erforderliche Reagenzien:

1. 96%iger Alkohol
2. 25%ige Salzsäure
3. 15%ige Kalilauge
4. Äther
5. 25%ige Ammoniaklösung
6. 20%iges Bariumchlorid
7. Konz. Schwefelsäure pro analysi.

Den Tagesstuhl wiegt man ab und verreibt ihn zu einer homogenen Masse. Dann wird 1 g abgewogen und mit etwas Sand und kaltem 96%igen Alkohol bei leicht kongosaurer Reaktion in einer Schale verrieben und durch mehrfaches Nachspülen mit Alkohol

restlos in einen Erlenmeier-Kolben übergeführt. Darauf wird der Stuhl im Rückflußkühler einige Minuten kochend extrahiert und abzentrifugiert oder abfiltriert. Der Rückstand wird erneut verrieben und mit Alkohol kochend extrahiert. Die gesammelten alkoholischen Auszüge werden mit etwa 5 ccm 15%iger Kalilauge versetzt und auf dem Wasserbade eingedampft. Der Alkohol soll vollständig verdampfen. Den Rückstand führt man mit etwa 50 ccm destilliertem Wasser in einen Schütteltrichter über und schüttelt zur Beseitigung des Cholesterins und des übrigen Unverseifbaren 3mal mit Äther aus. Der gesammelte Äther wird noch einmal mit einer geringen Menge dest. Wassers ausgeschüttelt; letzteres gehört zum wässerigen Teil, der auf dem Wasserbade zur Beseitigung des restlichen Äthers vorsichtig erwärmt wird. Nunmehr wird mit Salzsäure kongosauer gemacht, danach mit Ammoniak wieder alkalisch. Durch Zusatz von etwa 5—6 ccm Bariumchlorid werden die Fettsäuren ausgefällt; der Niederschlag wird abzentrifugiert oder abfiltriert. Die klare Flüssigkeit schüttelt man im Schütteltrichter nach Ansäuern mit Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion 3mal mit Äther aus. Den gesammelten Äther dampft man auf dem Wasserbade ein. Der Rückstand wird mit 10 ccm konz. Schwefelsäure versetzt. Die Ablesung der Fluoreszenz am Photometer erfolgt nach 24 Stunden in der schon beschriebenen Weise.

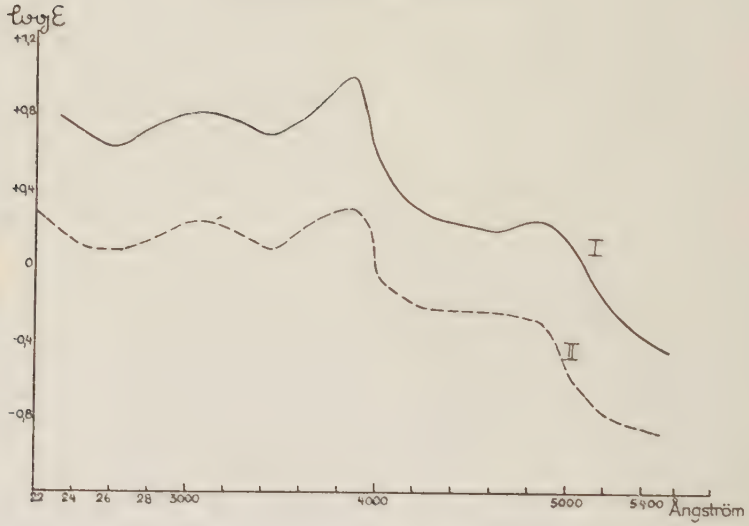
Mit dieser Methode hatten wir folgende Ergebnisse

Stuhl	1 g Stuhl ohne Zusatz	1 g Stuhl + 100 mg Ölsäure	1 g Stuhl + 10 mg Cholsäure
Gefundene Cholsäuremenge	2,2 mg	2,2 mg	10,9 mg
Berechnete Cholsäuremenge	—	2,2 mg	12,2 mg
Differenz	—	keine	— 11 %

Es ergibt sich demnach, daß die Ölsäure durch die Aufarbeitung quantitativ beseitigt sein mußte, da der Zusatz von 100 mg Ölsäure nicht den geringsten Fluoreszenzzuwachs verursachte; allerdings konnten die zugesetzten Gallensäuren auch nach unserer Methode nur mit einem Verlust von etwa 11 % wiedergewonnen werden.

Abbildung IV.

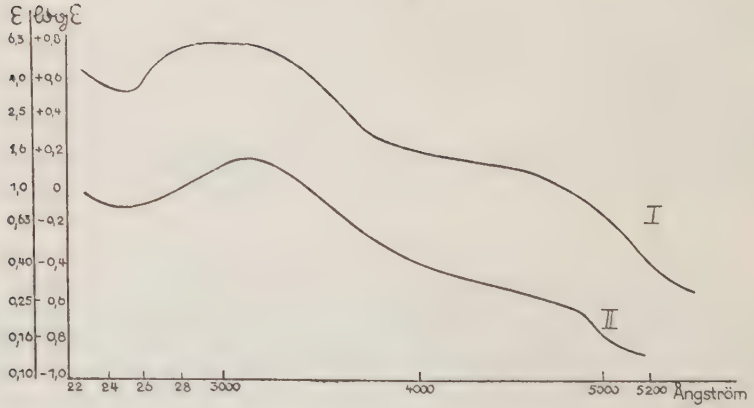
Absorptionskurven.



Stuhl mit Cholsäurezugabe:

I. Stuhlextrakt: 10fache Verdünnung
II. Stuhlextrakt: 40fache Verdünnung

Abbildung V.



Stuhl ohne Cholsäurezugabe:

I. Stuhlextrakt: 10fache Verdünnung
II. Stuhlextrakt: 40fache Verdünnung

Absorptionsaufnahmen der Stuhlextrakte.

Wir haben von den nach der Minnibeck'schen und unserer Methode gewonnenen Stuhlextrakten Absorptionsaufnahmen gemacht, um die Frage zu entscheiden, ob die im Stuhlextrakt beobachtete Fluoreszenz ausschließlich auf Gallensäuren zurückzuführen sei. Dabei zeigte sich, daß bei Cholsäurezugabe zum Stuhl die Cholsäurebande im Absorptionsspektrum stets deutlich ausgeprägt war. (Siehe Absorptionskurven, Abb. IV).

Die Stuhlpräparate ohne Cholsäurezugabe lassen keine selektive Bande und auch keine Stufe im Absorptionsverlauf erkennen, die für Cholsäure spricht (siehe Absorptionskurven ohne Zugabe, Abb. V); es wäre aber eine solche Bande deutlich zu erwarten, wenn die beobachtete Fluoreszenzhelligkeit nur auf Cholsäure zurückzuführen wäre. Hierzu ist noch folgendes hervorzuheben:

Eine gewisse Cholsäuremenge, die zur Herbeiführung selektiver Absorption ausreichen würde, ist im Stuhl zweifellos vorhanden und muß nach unserer Präparationstechnik in den untersuchten Stuhlextrakt übergegangen sein. Es wäre daher die Ansicht zu erörtern, daß die Cholsäure in einer etwas anderen Form im Stuhl vorliegt, die sich in Bezug auf die Absorption anders verhält als die Cholsäure, die wir zur Vergleichslösung und in Zusatzversuchen verwandten. Es kann hier auf unsere Aufnahmen des Natrium-dehydrocholat verwiesen werden, das in konz. Schwefelsäure nur eine mäßige Absorption mit verhältnismäßig schwachen Selektivitäten zeigt.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode angegeben, die Fluoreszenz der Cholsäure in konz. Schwefelsäure mit Hilfe des Pulfrich'schen Stufen-Photometers quantitativ auszuwerten.

   Untersuchungen über die Fluoreszenz anderer beim Menschen vorkommender spezifischer Gallensäuren: Desoxycholsäure, Anthropodesoxycholsäure und Lithocholsäure wurden nicht angestellt.
2. Die Absorption der verschiedenen Stuhlextrakte wird von 5200 Å bis 2300 Å quantitativ ermittelt.
3. Die Nachprüfung der von Giordano und Minnibeck angegebenen Vorschrift zur Isolierung und quantitativen Bestimmung der Gallensäuren im Stuhl ergab in zweifacher Hinsicht unbefriedigende Ergebnisse:

   1. Die Entfernung von störenden Beimengungen, die die Fluoreszenzreaktion ebenfalls geben, insbesondere Ölsäure, wird nicht erreicht.
   2. Zugesetzte Gallensäurenmengen werden nur mit großen Verlusten wiedergewonnen.

4. Nach einer eigenen Methode zur Aufarbeitung des Stuhles gelang es, eine quantitative Entfernung der störenden Ölsäure zu erzielen. Die Versuche mit zugegebenen Cholsäuremengen waren noch nicht befriedigend.
5. Sämtliche Absorptionsaufnahmen, die von den Stuhlextrakten ohne Gallensäurenzusatz gemacht wurden, lassen keine selektive Bande und auch keine Stufe im Absorptionsverlauf erkennen. Diese Tatsache deutet vielleicht darauf hin, daß die Gallensäuren im Stuhl in einer etwas anderen Form vorliegen, die sich in Bezug auf die Absorption anders verhalten als die Cholsäure, die wir zur Vergleichslösung und in Zusatzversuchen verwandten.

Literaturangabe.

(1) Raue: Zeitschrift für klinische Medizin 102; 79; 1926.
(2) Minnibeck: Biochemische Zeitschrift 257; 163; 1933.
(3) Giordano-Levy: Arch. Sci. med. 54; 1929.
Referat in Ronas Ber. 55; 630; 1930.
(4) Heilmeyer: Medizinische Spektrophotometrie, Verlag von Gustav Fischer in Jena 1933; S. 40—47.
(5) Beilstein: Handbuch der organischen Chemie: 2; 4. Aufl., S. 463.
(6) Zusammenfassende Darstellung über die Methoden zum Nachweis der Gallensäuren: Jenke: Archiv f. exper. Path. 163; 182—87; 1931.

Die Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Dozent Dr. Jenke unternommen, der mich in Bezug auf die chemische Bearbeitung in besonderem Maße unterstützt hat, wofür ich ihm hiermit danken möchte.

Herrn Dr. F. Bandow verdanke ich die Anleitung und große Hilfe bei den optischen Messungen und bei der Anfertigung der Absorptionsaufnahmen.

Der Quarzspektrograph und das Stufenphotometer wurden Herrn Prof. Dr. Bohnenkamp von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt. Außerdem ist der Freiburger Wissenschaftlichen Gesellschaft zu danken, die Herrn Dr. Bandow verschiedene Anschaffungen ermöglichte, die auch für meine Untersuchungen von Bedeutung waren.

Lebenslauf.

Am 20. August 1911 wurde ich, Willy Rudolf Erdlenbruch, als Sohn des Metzgermeisters Ernst Erdlenbruch in Elberfeld geboren. Ich besuchte zunächst die Volksschule, dann die Oberrealschule und bestand am 7. März 1930 die Reifeprüfung.

Meine vorklinischen Semester studierte ich in Bonn und Wien, im August 1932 legte ich in Bonn die ärztliche Vorprüfung ab.

Dann besuchte ich die Universitäten Kiel, Berlin und Freiburg, wo ich im Herbst 1935 mein medizinisches Staatsexamen mit „sehr gut" bestand. Seither bin ich als Medizinal-Praktikant an der Medizinischen Universitätsklinik tätig.

Der Alemanne, Verlags- und Druckerei-Gesellschaft m. b. H., Freiburg i. Br.